

氏名（本籍）	宮 寄 靖 則	（東京都）
学位の種類	博士(薬学)	
学位記番号	乙 第141号	
学位授与年月日	平成16年9月8日	
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当者	
学位論文の題名	水溶性デキストラン誘導体を用いた粘膜付着型徐放性微粒子製剤の開発	
論文審査委員	主 査	教 授 高 山 幸 三
	副 査	教 授 上 田 晴 久
	副 査	教 授 杉 山 清

## 論文内容の要旨

天然高分子であるデキストランは、*leuconostoc mesenteroides*によりショ糖から産生されるブドウ糖の重合体で、その結合の大部分が $\alpha$ -1, 6結合である高分子である。この水酸基の一部を化学修飾して製した水溶性デキストラン誘導体は一般に安全性が高く、生体適合性、生分解性を有している。このことから薬物分子に水溶性デキストラン誘導体をキャリアーとして化学結合させ、ターゲティングに利用する試みが行われてきた。しかし、デキストランの持つ高い水溶性から、そのほかの DDS に応用された例は少ない。この問題を解決するために脂溶性誘導体化する方法あるいは化学的に架橋する方法が考案されてきた。しかしこれらの方法を用いた場合、残留する有機溶媒や架橋剤による有害反応の恐れがある。そこで本研究では、物理的な架橋方法の1つであるイオン結合による複合化を利用することを試みた。

水溶液中で、互いに反対の荷電を有する高分子電解質が複合体を形成することはよく知られている。このとき形成される高分子電解質複合体の性質は高分子の化学構造、分子量、柔軟性、官能基の種類、荷電密度、親水性—疎水性バランス、立体構造などに影響され、また反応条件、例えば水溶液のpH、イオン強度や温度、あるいは高分子の濃度や混合比によっても変化する。そこでまず水溶性デキストラン誘導体の解離度について調べ、次いで高分子電解質複合体の形成について検討した。本研究では置換基を異にする4種類の水溶性デキストラン誘導体、すなわち酸性弱電解質としてカルボキシメチルデキストランナトリウム（CMD）、酸性強電解質としてデキストラン硫酸ナトリウム（DS）、

塩基性弱電解質として塩化[2-(ジエチルアミノ)エチル]デキストラン(EA)そして塩基性強電解質として塩化[2-ヒドロキシプロピルトリメチルアンモニウム]デキストラン(CDC)を用いて検討を行った。CMDの解離度はpHによって大きく変化し、変曲点をpH4にもつシグモイド曲線となった。EAの解離度もpHによって大きく変化し、シグモイド曲線を2つつなぎ合わせた形となり、変曲点はpH5.9と9.0に認められた。一方、DSとCDCの解離度はそれぞれpH3以下あるいはpH11以上で多少低下するが、その他のpH域ではほぼ一定であった。次いで高分子電解質複合体の形成について希薄水溶液混合後の濁度を測定することにより検討した。CMD/EA系、CMD/CDC系およびDS/EA系においては実験的な当量組成がpHによって変化した。DS/CDC系では溶液のpHに依らず実験的な当量組成はほぼ同一であった。pH6.8における実験的な当量組成は、CMD/EA系およびCMD/CDC系では35:65、DS/EA系およびDS/CDC系では25:75であった。高分子の分子量が低くなると濁度曲線の広がりが大きくなり、幅広い組成比を有する複合体が形成された。複合体形成反応の当量性を検討した結果、CMD/EA系においては、分子量が大きい場合実験値と理論値は良く一致したが、分子量が小さいとpHの低下とともにCMDの比率の実験値が理論値より小さくなった。CMD/CDC系においては分子量に依らず実験値と理論値がほぼ一致した。一方DS/EA系およびDS/CDC系では、DSの比率の実験値が理論値より大きくなる傾向を示した。濁度は、高分子の組み合わせが両方あるいは片方が弱電解質の場合、塩化ナトリウム添加の影響を受け、強電解質同士の場合、塩化ナトリウム濃度に影響されなかった。弱電解質を用いた複合体は、両性電解質の性質を帯び、不溶化していないことが示唆された。

この研究過程において水溶性デキストラン誘導体あるいは反対荷電を有する水溶性デキストラン誘導体の物理混合物が水和すると粘膜付着性を示すことが判明したため、*in vitro*における粘膜付着性を圧縮成型物の形で評価した。手法としては、化学的な相互作用だけでなく機械的な力も検出することができ最も汎用されている張力試験を用いた。モデル粘膜としては、ブタ胃粘膜から精製されたムチンを成膜して用いた。また粘膜付着性が広く認められている高分子として、カーボポール934P(CP)、ヒドロキシプロピルセルロース(HPC)、キトサン(CS)を対照として用い付着力の指標とした。個々の水溶性デキストラン誘導体を単独で用いた場合の付着力は、pH1.2条件下のCDCを除いて、CSの付着力より有意( $p < 0.01$ )に高かった。またすべての水溶性デキストラン誘導体の付着力はCPと比較しては有意差( $p < 0.01$ )がなく同等の値を示した。

またその付着力に pH による差は見られなかった。反対荷電をもつ 2 種類の水溶性デキストラン誘導体の混合物の付着力は、ポリアニオンとポリカチオンの組み合わせおよび混合比率に影響されなかった。また環境因子である pH とイオン強度の影響は小さかった。4 種すべての混合物において、接触時間が長くなるに従い付着力が増加した。DS / CDC 系において、分子量の大きな水溶性デキストラン誘導体を用いた混合物の付着力は、分子量の小さいものと比較して有意 ( $p < 0.05$ ) に大きな値を示した。これらの結果から、物理混合物の粘膜付着においては分子鎖の相互侵入および絡み合いが支配的であり、化学的な相互作用の寄与は小さいことが示唆された。

水溶性デキストラン誘導体を微粒子製剤へ応用する場合、比表面積が大きいために物理混合物とするだけで放出を抑制することは困難である。そこで物理混合物が作る親水性マトリックスを強固に保ち形状を保持するために、疎水性マトリックスとしてセルロースアセテートブチレート (CAB) を利用したハイブリッドマイクロスフェアの調製を試みた。調製したマイクロスフェアはほぼ球形で、モノリティックな構造を示した。さらにモデル薬物としてテオフィリンを用い、薬物放出挙動に影響を与える因子について日本薬局方 XIV 溶出試験法第 2 法に準じて放出試験を行い検討した。ポリアニオンとポリカチオンの組み合わせを異にする物理混合物を親水性マトリックスとして用いた 4 種類のマイクロスフェアの中で、DS / EA 系において薬物放出がもっとも抑制された。また、DS / EA 系および DS / CDC 系においては薬物放出挙動が日本薬局方崩壊試験法第 1 液と第 2 液で変化しなかった。DS / CDC 系を用いて、ポリアニオンとポリカチオンの混合比が薬物放出に及ぼす影響について検討した結果、複合体形成の最適比において平均溶出時間がもっとも大きな値を示し、マイクロスフェアからの薬物放出が強く抑制された。マイクロスフェア中の薬物含有比率を一定とし、水溶性デキストラン誘導体と CAB の比率を変化させることにより、薬物放出を制御できることがわかった。

次いで水溶性デキストラン誘導体として DS と EA の混合物を用いて製したマイクロスフェアの粘膜付着性について検討した。マイクロスフェアの水和挙動を観察した結果、水に接触後非常に速やかに水溶性デキストラン誘導体の膨潤が起こり、マイクロスフェア表面への突出が見られた。マイクロスフェアの *in vitro* 粘膜付着性についてラットの反転腸管を用いて検討した結果、水溶性デキストラン誘導体含有率が 40 % および 50 % のマイクロスフェアでは、1.5 時間後においても 75 % 以上が付着していた。マイクロスフェアをラットに経口投与後

胃および小腸を直接剖検した結果、水溶性デキストラン誘導体含有率が40%のマイクロスフェアでは1時間後に80%以上が胃内に残存していた。一方、乳糖を用いた対照のマイクロスフェアでは1時間後25%が胃内にあった。両者とも3時間後にはほとんどが小腸下部に移行した。マイクロスフェアの消化管内移動挙動についてモデルを用いて検討した結果、水溶性デキストラン誘導体含有率40%のマイクロスフェアは対照のマイクロスフェアに比べて胃排出時間が延長していた。また50%大腸到達時間には差がなかった。

経口投与されたマイクロスフェアが薬物吸収部位に局在し残留すれば、薬物のバイオアベイラビリティは向上すると考えられる。そこで消化管全域から吸収されるテオフィリンと吸収部位が上部消化管に限られるチアミンジスルフィドを用いた粘膜付着性マイクロスフェアを調製し、ラット経口投与後の薬物吸収挙動について検討した。対照として、*in vitro*における薬物放出挙動が同等で粘膜付着性がないマイクロスフェアを調製した。*in vitro*放出試験において、テオフィリンの場合4時間で90%以上、チアミンジスルフィドの場合2時間で85%以上放出した。ラット経口投与後の薬物動態を解析した結果、テオフィリンの場合、懸濁液と比べ粘膜付着性マイクロスフェアでは $C_{max}$ が低下し、 $T_{max}$ および $MRT_{\infty}$ が延長した。しかし対照のマイクロスフェアとの間に有意差が見られなかった。チアミンジスルフィドの場合、水溶液および対照のマイクロスフェアと比べ、粘膜付着性マイクロスフェアでは $AUC_{\infty}$ および $MRT_{\infty}$ の値が有意( $p < 0.05$ )に増大した。

結論として、水溶性デキストラン誘導体の物理混合物は薬物徐放性および粘膜付着性を併せ持つことが明らかとなった。これを微粒子製剤へ応用することにより、経口投与後長時間胃内に滞留する粘膜付着型マイクロスフェアを開発し、消化管上部に吸収部位を持つ薬物のバイオアベイラビリティを向上させることを見い出した。

粘膜付着型徐放性製剤の応用範囲としては、経口投与のほかに鼻粘膜や口腔粘膜、直腸粘膜などへの適用があり、今後さまざまなDDS剤形への応用が期待される。

## 論文審査の結果の要旨

水溶性デキストラン誘導体は、生体適合性に優れることから、新しい製剤素材としての応用が期待される。本研究では、反対荷電を有する水溶性デキストラン誘導体4種を選択し、これら誘導体間のポリイオンコンプレックス形成反応を利用した新規粘膜付着型徐放性微粒子製剤の開発が行われた。薬物の消化管吸収過程には、製剤の消化管移動速度と剤形からの薬物放出速度の両者が関与する。製剤の消化管移動は水溶性デキストラン誘導体の粘膜付着性により制御され、また剤形からの薬物放出は、ポリイオンコンプレックス形成に伴って構築される三次元網目構造により制御されると考えられる。本研究では、多くのデキストラン誘導体の中から、電荷の正負ならびに解離の強弱を考慮し、次に示す誘導体を選択され以後の実験に供された。すなわち、アニオン性弱電解質であるカルボキシメチルデキストランナトリウム (CMD)、アニオン性強電解質であるデキストラン硫酸ナトリウム (DS)、カチオン性弱電解質である塩化[2-(ジエチルアミノ)エチル]デキストラン (EA) およびカチオン性強電解質である塩化[2-ヒドロキシ3-(トリメチルアンモニオ)プロピル]デキストラン (CDC) が選択され、*in vitro* および *in vivo* における種々の検討が行われた。以下に研究成果を要約する。

ポリイオンコンプレックスの形成と薬物放出挙動 ポリイオンコンプレックス形成の確認ならびに最適結合比を推定するために、各デキストラン誘導体の希薄水溶液を調製し、pHと混合比を変化させながら、混合溶液の濁度を測定した。その結果、CMD/EA、CMD/CDCおよびDS/EA系では、濁度が極大となる混合比のpH依存的な変化が見られた。一方、DS/CDC系では濁度の極大を示す混合比はpHに依らず一定であった。これは弱電解質ではその解離状態が溶液のpHに依存して変化するのに対し、強電解質ではポリイオンコンプレックスの形成がpHによる影響をほとんど受けないことを示している。次に、最適比率から成るデキストラン誘導体混合物を親水性マトリックスとし、セルロースアセテートブチレートを疎水性マトリックスとしたハイブリッド型微粒子製剤を作成し、テオフィリンをモデル薬物として放出挙動を検討した。その結果、DS/EAの組合せにより、放出液のpHの影響を受けることなく最大の薬物放出抑制効果が得られた。

粘膜付着力の評価 圧縮成形したデキストラン誘導体混合物の付着力を、モデル粘膜としてムチン膜を用いて検討した結果、混合物はいずれもカーボポー

ル 934P と同等の強い付着力を示した。付着力は pH あるいはイオン強度の影響を受けないことから、分子鎖の相互侵入および絡み合いにより惹起され、化学的な相互作用の寄与は小さいことが示唆された。良好な放出抑制能を示した DS/EA を素材とする微粒子製剤を選択し、ラット反転腸管を用いた消化管粘膜付着性を測定した。その結果、微粒子の付着性は DS/EA 含有率の増大とともに上昇し、40% 以上含有する場合には、実験開始後 1.5 時間でも 75% 以上の付着が見られた。DS/EA を含有する微粒子製剤は、水に接触後速やかに DS/EA が膨潤し粒子表面への突出が起こる。この現象が付着に有効に寄与しているものと推察された。

消化管移動と薬物吸収動態の解析 微粒子製剤をラットに経口投与し、一定時間後に胃および小腸を直接剖検した結果、DS/EA 含有率 40% の製剤では、1 時間後に 80% 以上が胃内に残存していた。さらに消化管内移動挙動を動態モデルに基づいて解析した結果、胃内滞留性の有意な増大が確認された。モデル薬物として、消化管全域から吸収されるテオフィリンと吸収部位が上部消化管に限られるチアミンジスルフィドを用い、ラット経口投与後の薬物動態を検討した。その結果、テオフィリンでは、 $C_{max}$  の低下、 $T_{max}$  および MRT の延長が認められ、持効性製剤としての有用性が示された。しかし対照として用いた粘膜付着性の無い微粒子製剤との間に有意な差は見られなかった。一方、チアミンジスルフィドを主薬とした微粒子製剤では、粘膜付着性を持たない微粒子製剤に比較して AUC および MRT の有意な増大が認められた。

以上より水溶性デキストラン誘導体を利用した粘膜付着性微粒子製剤は、吸収部位が上部消化管に局限される薬物の生物学的利用能を向上させる手段として有用であり、本論文の内容は博士の学位に相応しいものである。